

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-261717

(43)Date of publication of application : 21.11.1991

(51)Int.Cl.

A61K 7/22

(21)Application number : 02-059522

(71)Applicant : SUNSTAR INC

(22)Date of filing : 09.03.1990

(72)Inventor : SUIDOU HIROHISA
KATSUTA TOMOKO
NAKAMURA SHOICHI

(54) COMPOSITION FOR ORAL CAVITY APPLICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a composition for oral cavity application effective in suppressing the adhesion of oral bacteria to the tooth and the periodontium and useful for the prevention and remedy of dental caries and periodontosis by compounding a peptide having a specific amino acid constitution.

CONSTITUTION: The objective composition is produced by compounding a peptide composed of 3-34 (preferably 4-24) amino acids and having one or more peptide parts containing ≥ 2 (preferably 2-4) consecutive sequence of basic amino acids (preferably arginine, lysine and histidine) in the molecule. The peptide is e.g. Gly-His-Lys. The peptide is used singly or as a combination of two or more peptides in an amount of 0.001-5wt.%, especially preferably 0.01-0.5wt.% in the composition.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平3-261717

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)11月21日

A 61 K 7/22

7252-4C

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 口腔用組成物

⑮ 特 願 平2-59522

⑯ 出 願 平2(1990)3月9日

⑰ 発 明 者 水 道 裕 久 大阪府河内長野市本町20-33
⑰ 発 明 者 勝 田 倫 子 大阪府大阪市生野区中川2-12-17
⑰ 発 明 者 中 村 正 一 大阪府高槻市宮が谷町586-21
⑱ 出 願 人 サンスター株式会社 大阪府高槻市朝日町3番1号
⑲ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

口腔用組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 分子内に塩基性アミノ酸が2つ以上連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3~34個のアミノ酸からなるペプチドを配合してなることを特徴とする口腔用組成物。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は口腔内細菌の歯牙および歯周組織への付着を抑制する効果を有し、かつ、う蝕および歯周病の予防、治療効果を有する口腔用組成物に関する。

従来の技術および課題

う蝕や歯周病は、ある種の口腔内細菌が原因で発症することが明らかであり、例えば、バクテロイデス・ジンジバリス(*Bacteroides gingivalis*)等の歯周病原性菌は歯牙や歯周組織に付着、定着し、それらの菌の産生する酵素や内毒素等により

歯周組織を破壊し、歯周病を引き起こす。

そのため、歯周病の発症を防止する目的でバクテロイデス・ジンジバリスの付着を抑制する方法が検討され、例えば、アミノ酸の一種であるアルギニンやリジンが該細菌の頬粘膜上皮細胞への付着を抑制する等の報告がある(口腔衛生学会誌 38:590~591、1988)。しかしながら、これらは対象とする細胞が歯周組織由来のものでなかったり、また、その効果が弱いという問題がある。

このような事情に鑑み、本発明者らは、う蝕および歯周病の予防、治療に有効な薬剤について種々、検討したところ、意外にも、特定のペプチドが適していることを見出し、本発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

本発明は、分子内に塩基性アミノ酸が2つ以上連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3~34個のアミノ酸からなるペプチドを配合してなる口腔用組成物を提供するものである。

該ペプチドはバクテロイデス・ジンジバリス等の歯牙や歯周組織への付着を効果的に抑制するので、本発明の口腔用組成物は歯や歯周病の予防、治療用の歯磨剤や医薬品として有用である。なお、本明細書で用いるペプチドの構成アミノ酸およびその保護基等についての略号はペプチドの分野で通常用いられるものである。例えば、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Lysはリジン、Argはアルギニン、Proはプロリン、Gluはグルタミン酸、Glnはグルタミン、Serはセリン、Asnはアスパラギン、Valはバリン、Ileはイソロイシン、Leuはロイシン、Tyrはチロシン、Bocはt-ブトキシカルボニルを表す。

用いるペプチドは、分子内に塩基性アミノ酸、好ましくは、アルギニン、リジン、ヒスチジンが2つ以上、好ましくは2〜4つ連続して結合したペプチド部分を1ヶ所以上有する合計3〜34個のアミノ酸、好ましくは4〜24個のアミノ酸からなるものである。かかるペプチドは、例えば、後記の参考例に示すように、公知の方法によって

容易に合成できる。代表的なものとしては、

Gly-His-Lys、Gly-His-Arg-Pro、Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu、Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg、Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys、Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-Val-Phe-Ser、Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro、Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-Met-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe、His-Arg-Gly-Tyr、Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr、Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr、Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyrおよびこれらの-CO

OHおよび-NH₂における製剤上許容される塩が挙げられる。

本発明の口腔用組成物においては、これらペプチドは単独で、あるいは2種以上組合せて用いることができ、組成物中の該ペプチド配合量は0.001〜5重量%、特に0.01〜0.5重量%が好ましい。

本発明の口腔用組成物は常法に従って、練歯磨、粉歯磨、液状歯磨、マウスウォッシュ、チュウイングガム、うがい液、トローチ、パスタ、クリーム、軟膏剤、貼付剤、錠剤のごとき歯磨剤や医薬品とすることができる。他の配合成分は特に限定するものではなく、通常、この種の組成物に用いられる成分を配合できる。例えば、練歯磨であれば研磨剤、粘結剤、湿潤剤、甘味剤、香料、防腐剤、他の薬効剤等が適宜配合される。

医薬品の場合、内服の場合は、成人1日当たり、ペプチド量として5〜50mg、外用の場合、ペプチド量として1回に1〜数10mgの用量で、有害な副作用なしに歯や歯周病の予防、治療に用い

ることができ、歯磨剤の場合は、これらの用量を勘案して常法に従って使用する。

作用

以下、実験により本発明に用いるペプチドの作用を具体的に示す。

(実験1)

歯肉上皮細胞へのバクテロイデス・ジンジバリス381株の付着に及ぼす影響

嫌気条件下で、48時間培養したバクテロイデス・ジンジバリス381株を0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0、PBS)にてよく洗浄した後、PBSに懸濁した。一方、ヒト歯肉上皮細胞を歯周炎の認められない成人より採取し、よく洗浄した後、PBSに懸濁した。該細菌懸濁液(1×10⁸菌体/ml)と上皮細胞懸濁液(1×10⁶細胞/ml)を1mlずつ混合し、37℃で30分間、振盪しながらインキュベートし、バクテロイデス・ジンジバリス381株の歯肉上皮細胞への付着反応を行わせた。反応終了後、上皮細胞を孔径12μmのメンブレンフィルターに

て集めた。集めた上皮細胞をPBSに懸濁し、ガラススライドに塗抹し、自然乾燥させた後、大炭固定してゲンチアナバイオレットで染色した。上皮細胞に付した菌体数を、光学顕微鏡下(倍率 10×40)で無作為に30個の上皮細胞を選び、上皮細胞1個当たりの付着菌数で算定した。また、陰性対照として、上皮細胞をPBSのみと反応させ、上皮細胞に初めから付着していた菌体数を求めて陰性対照値とし、バクテロイデス・ジンジバリスの上皮細胞への付着数として、前記算定値から陰性対照値を差し引いた値を用いた。バクテロイデス・ジンジバリスの上皮細胞への付着に及ぼすペプチドの影響はバクテロイデス・ジンジバリスを予め室温にて15分間、これらの物質と反応させた後、前記と同様の方法で調べた。結果を以下の第1表に示す。

第1表(続き)

薬剤 (濃度:0.1mM)	上皮細胞1個 当たりの付着菌数 (平均値±標準偏差)	対照に対する 相対比率(%)
His-Arg-Gly-Tyr	15±9	21
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	10±4	14
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-	5±3	7
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr		
Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-	3±2	4
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-		
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr		
Glu-Ala-Glu-Asn*	75±24	104
Pyr-Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Pro*	68±20	94

*:比較例

第1表

薬剤 (濃度:0.1mM)	上皮細胞1個 当たりの付着菌数 (平均値±標準偏差)	対照に対する 相対比率(%)
PBS(対照)	72±21	100
Gly-His-Lys	20±11	28
Gly-His-Arg-Pro	14±8	19
Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu	2±1	3
Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg	9±5	13
Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys	7±6	10
Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-	4±3	6
Val-Phe-Ser		
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-	2±2	3
Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-		
Lys-Val-Tyr-Pro		
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-		
Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-	7±4	10
Met-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Gln-Asp-		
Val-His-Asn-Phe		

第1表に示すごとく、比較例のペプチドでは抑制は認められなかったが、本発明に用いるペプチドは細胞の上皮細胞への付着を著しく抑制した。

(実験2)

唾液被覆ヒドロキシアパタイト(HAP)ビーズ上へのバクテロイデス・ジンジバリス381株の付着に及ぼす影響

20mgのHAPビーズをヒトの唾液(血液型O)0.5mlとともに室温にて1時間インキュベートした。該ビーズを0.05M KCl、1mM KH₂PO₄、1mM CaCl₂および1mM MgCl₂からなるpH6.0の緩衝液(この緩衝液は、唾液無機成分のモデルである)1mlで2回洗浄した。ついで、室温にて、該ビーズをpH7.0の試料溶液0.5mlとともに1時間インキュベートし、前記緩衝液1mlで2回洗浄した。

つぎに、前記緩衝液0.5ml中に[³H]チミジン標識バクテリア(バクテロイデス・ジンジバリス)を 5.0×10^6 個含む懸濁液を該ビーズに添加し、室温にて1時間インキュベートした。前記緩衝液

1mlで3回洗浄し、ビーズをバイアルに移し、液体シンチュレーションカウンターを用いて放射能を計測した。一方、既知の³H]標識細胞の割合を同じ方法で計数し、バクテリア数の換算値を作成した。結果を以下の第2表に示す。

第2表(続き)

薬剤 (濃度:0.1mM)	唾液被覆HAP20mg 当たりの付着菌体数 ($\times 10^4$ 個)	対照に対する 相対比率(%)
His-Arg-Gly-Tyr	1.0	20
Lis-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	0.7	14
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-	0.3	6
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr		
Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-	0.1	2
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-		
Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr		
Glu-Ala-Gln-Asn*	5.1	102
Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Pro*	4.7	94

*:比較例

第2表

薬剤 (濃度:0.1mM)	唾液被覆HAP20mg 当たりの付着菌体数 ($\times 10^4$ 個)	対照に対する 相対比率(%)
PBS(対照)	5.0	100
Gly-His-Lys	0.7	14
Gly-His-Arg-Pro	0.5	10
Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu	0.07	1
Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg	0.1	2
Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys	0.08	2
Lys-Lys-Arg-Pro-Gln-Arg-Ala-Thr-Ser-Asn-	0.03	0.6
Val-Phe-Ser		
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-	0.06	1.2
Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-		
Lys-Val-Tyr-Pro		
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-		
Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Arg-		
Met-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-		
Val-His-Asn-Phe	0.14	3

第2表に示すごとく、本発明に用いるペプチドにより細菌の唾液被覆HAPへの付着が著しく抑制された。

(実験3)

バクテロイデス・ジンジバリスの付着阻害におけるペプチドの濃度依存性

種々の濃度を有するペプチドを用い、実験1の方法と同様にペプチドによるバクテロイデス・ジンジバリスの歯肉上皮細胞への付着阻害効果を開いた。結果を以下の第3表に示す。

第3表

薬剤	濃度 (mM)	上皮細胞1個 当たりの付着菌数 (平均値±標準偏差)	対照に対する 相対比率(%)
PBS(対照)		72±21	100
Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	0.001	41±20	57
	0.01	32±14	44
	0.1	10±4	14
	1.0	0	0

第3表に示すごとく、濃度0.001mMにおいてもペプチドの付着阻害効果が認められた。

(実験4)

ペプチドによるハムスター歯周病所へのバクテロイデス・ジンジバリスの定着阻害効果

5週令の無菌ハムスター6匹を2群に分け、実験開始日、第1群のハムスターの下顎臼歯に純粋で0.1mM薬液を散布し、第2群には対照としてPBSを散布した。引き続き、対象の臼歯に結紮糸を施し、約10⁶/鼠に調整したバクテロイデス・ジンジバリスESO132株生菌液を投与した。

その後、薬液およびPBS溶液の散布は1日1回で、毎日行い、菌液の投与は1週間に2回の割合で6週間にわたって行った。

最終菌液投与後、1週間後に実験部位の歯肉の炎症の程度を観察すると共に、結紮糸をはずした後、その部位のブランクをキュレットで採取し、速急に保持したリンガー液に浸漬し、このサンプル中のバクテロイデス・ジンジバリス数を培養

法により計数した。結果を以下の第4表に示す。

第4表

散布液	ハムスター No.	サンプル1ml当たり のバクテロイデス・ ジンジバリス数	歯肉炎症指数*
PBS(対照)	1	1×10 ⁷	3
	2	8×10 ⁶	3
	3	3×10 ⁷	3
	4	2×10 ⁶	2
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu- Lys-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr	5	5×10 ⁶	1
	6	8×10 ⁶	1

* 歯肉炎症指数
3:重度の炎症
2:中度の炎症
1:軽度の炎症
0:炎症なし

第4表に示すごとく、薬液処理群では、対照群に比べて歯周局所へのバクテロイデス・ジンジバリスの定着が著しく抑制されると共に、歯肉の炎症の程度も軽かった。

実施例

つぎに参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。実施例中、「%」はいずれも重量%である。

参考例

用いたペプチドはBoc-アミノ酸無水物法を採用しているAB I ペプチドシンセサイザー430 Aを用いて固相法により合成した。側鎖を保護したBoc-アミノ誘導体はAsp(OcHex)、Ser(Bzl)、His(α -Bom)、Lys(i-z)、Arg(Tos)、Tyr(Br-Z)およびGlu(OcHex)であり、合成の出発物質としてBoc-Tyr(Br-Z)-PAM樹脂を用いたペプチド鎖の組み立てが終了した後、ペプチドが結合した樹脂を10%アニソールを含む無水HFで、0℃にて75分処理した。HFを蒸発させた後、遊離したペプチドを5%酢酸で抽出

し、凍結乾燥した。粗ペプチドはODSカラムで精製し、凍結乾燥した。ついで、得られたペプチドを塩酸で110℃にて24時間加水分解し、各々、アミノ酸含量を測定した。代表的なペプチドのアミノ酸含量を以下に示す。

ペプチド(I)	ペプチド(II)	ペプチド(III)
Ser1.0	Ser1.0	Asp1.2
Gly1.1	Glu1.2	Ser2.0
Try1.0	Gly2.3	Glu1.2
His2.9	Tyr2.0	Gly2.4
Lys1.0	Phe1.0	Ala1.2
Arg1.0	His4.0	Tyr2.1
	Lys2.9	Phe1.0
	Arg2.0	His6.9
		Lys3.9
		Arg3.0

ペプチド(IV)
His1.0
Arg1.0
Gly1.1

Tyr1.0

実施例1(練歯磨)

つぎの処方により、常法に従って練歯磨を製造した。

成分	配合量(重量%)
第二リン酸カルシウム	45.0
カルボキシメチル	
Lys-His-His-Ser-His-Arg-	0.5
Gly-Tyr	
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-	0.5
Glu-Lys-His-His-Ser-His-	
Arg-Gly-Tyr	
セルロースナトリウム	0.5
グリセリン	20.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5
サッカリンナトリウム	0.1
蒸留水	100%に調整

実施例2(練歯磨)

つぎの処方により、常法に従って練歯磨を製造した。

成分	配合量(重量%)
炭酸カルシウム	45.0
Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-	1.0
Glu-Lys-His-His-Ser-His-	
Arg-Gly-Tyr	
セルロースナトリウム	1.0
グリセリン	20.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5
サッカリンナトリウム	0.1
香料	1.2
蒸留水	100%に調整

実施例3(マウスクウォッシュ)

つぎの処方により、常法に従ってマウスクウォッシュを製造した。

成分	配合量(重量%)
エタノール	10.0
Lys-His-His-Ser-His-Arg-	0.1
Gly-Tyr	
ポリオキシエチレン(60EO)	0.5
硬化ヒマシ油	

モノオレイン酸ポリオキシエチレン 0.5

(20EO)ソルビタン

サッカリンナトリウム 0.2

防腐剤および香料 0.8

蒸留水 100%に調製

実施例4(マウスウオッシュ)

つぎの処方により、常法に従ってマウスウオッシュを製造した。

成 分	配合量(重量%)
エタノール	15
グリセリン	15
ポリオキシエチレン(60EO)	1
硬化ヒマシ油	
Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-	0.05
His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-	
His-Gln-Lys-His-His-Ser-His-	
Arg-Gly-Tyr	
塩化セチルピリジニウム	0.05
サッカリンナトリウム	0.1
香料	0.5

蒸留水 100%に調製

実施例5(口腔用パスタ)

つぎの処方により、法に従って口腔用パスタを製造した。

成 分	配合量(重量%)
白色ワセリン	10.0
ステアリンアルコール	8.0
プロピレングリコール	5.6
ラウリル硫酸ナトリウム	0.6
パラオキシ安息香酸エチル	0.01
蒸留水	16.0
Lys-His-His-Ser-His-Arg-	2.0
Gly-Tyr	
カルボキシメチルセルロース	100%に調製
ナトリウム	

発明の効果

本発明によれば、う蝕および歯周病の予防、治療に有用な口腔用組成物が得られる。

特許出願人 サンスター株式会社

代理人 弁護士 青山 保 ほか1名